

Skadelig effekt av Valproat på fosterhjerne; litteraturgjennomgang og dyreeksperimentell pilotstudie

Siri Schøne Ness

**Medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo
Juli, 2010**

**Veiledere:
Jan Mæhlen**

Overlege og professor 2

Patologisk-anatomisk avdeling, Ullevål universitetssykehus

Petra Aden

Stipendiat og barnenevrolog

Patologisk anatomisk avdeling, Ullevål Universitetssykehus

Innhold

Abstract	3
Ordforklaringer	4
1.0 LITTERATURGJENNOMGANG	5
1.1 Valproat som medikament	5
1.2 Metabolisme av Valproat under graviditet og i ammefasen	5
1.3 Valproat og Teratogenitet	6
1.4 Valproatembryopati	6
1.5 Valproats effekt på psykomotorisk utvikling	7
1.6 Molekylære virkningsmekanismer	8
1.7 Lillehjernen og dens utvikling	8
2.0 PRAKTISK DEL	14
2.1 Introduksjon	14
2.2 Hensikt	17
2.3 Material og metode	17
3.0 RESULTAT	21
3.1 Apoptosetelling	21
3.2 Immunhistokjemi	22
3.3 Celledødsbestemmelse ved Trypan blå farging	23
4.0 Diskusjon	25
Referanser	26

Abstract

The antiepileptic drug Valproic acid (Val) is a known human teratogen. The risk is dose dependent and when the daily doses in pregnancy exceed 1400 mg up to 15% may be affected. The main clinical findings of the valproic acid congenital syndrome include lumbosacral meningocele, intrauterine growth retardation, long forehead, flat nasal bridge, hypertelorism, epicanthal folds, long and smooth philtrum, narrow mouth with thin upper lip and rich under lip, small backwards rotated ears and overlapping toes. Many of the children will also suffer from developmental delay with reduced cognitive function, attention deficit disorder and learning difficulties.

Rats exposed to Val in fetal life show abnormal cranial nerve nuclei, reduction in the number of cerebellar Purkinje cells and reduced size of the cerebellar hemisphere. The same histological changes were found in people with autism. It has therefore been proposed that the Val-exposed rat may serve as an animal model for autism.

The aim of the present pilot study is to look for possible detrimental effects of Val exposure on the mitotic and apoptotic activity in immature granule neurones of the developing chick cerebellum.

The chicken embryos were exposed to Val on embryonic day 16 (E16). Val was injected in four different concentrations (5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg and 40mg/kg). The embryos were killed 24 hours later and the brains were fixed in paraformaldehyde. Coronal sections of the cerebellum were stained with H+E and PCNA and prepared for light microscopic examination. The results show that compared with saline injected control embryos the Val exposed embryos demonstrated a dose-dependent increase in granule cell apoptosis in the cerebellum. There was also an increase in granule cell proliferation with higher doses of Val. These results indicate that developing chick cerebellum may be a suitable model system to study neurotoxic Val effects in fetal life.

Ordforklaringer

UDPGT: uridin-difosfat-glukotonyl-transferase. Katalyserer overføringen av glukuronsyre til mange endogene eller tilførte stoffer som ledd i avgiftningen av stoffene. Enzymet finnes i det endoplasmatiske retikulum i hepatocytene.

CYP: Stor enzymgruppe i cytocrom P450 systemet som kan nøytralisere medikamenter og andre stoffer. Kan oppreguleres ved induksjon.

REB4: Endotelceller i hjernen.

CaC0-2: Endotelceller i tarmen

MCT1: Monocarboxylase transporter

Hypospadi: Medfødt misdannelsen av penis slik at urinrøret munner ut på undersiden av penisskaftet.

Polydaktyli: For mange fingre eller tær.

Clinodaktyli: Skjev stilling av fingrene.

Kryptorkisme: Fravær av en eller begge testiklene i pungen fordi de ikke har vandret skikkelig ned i pungen i fosterlivet.

Metopisk kraniosynostose: Prematur lukning av sutura metopica medfører hemmet vekst av os frontale og en kjølforming av pannen (trigonocefali).

Palatum fissum: Medfødt åpen gane, ganespalte.

Hemangiom: Godartet svulst oppbygd av blodårer.

Encefalopati: Sykdom i hjernen.

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic acid

1.0 LITTERATURGJENNOMGANG

1.1 Valproat som medikament

Valproat (Val) er en fettsyre med bredspektret antiepileptisk effekt^[1]. Indikasjoner for bruk er generaliserte epilepsianfall, særlig juvenil myoklon epilepsi (en generalisert idiopatisk epilepsiform). Val anvendes også mot partielle epilepsianfall, status epilepticus (vedvarende eller gjentatte epileptiske anfall som varer over 30 minutter) hos voksne, mot bipolar lidelse og som migreneprofylakse.

Natriumvalproat i mikstur absorberes hurtig. Maksimal plasmakonsentrasjon nås innen 1-4 timer. Den biologiske tilgjengeligheten er nesten fullstendig (90- 100 %). Den terapeutiske serumkonsentrasjonen har noe individuell variasjon, men vil hos de fleste ligge i området mellom 300-700µmol/liter. Klinisk effekt oppnås ofte først etter 3-4 ukers behandling.

Val har en halveringstid i serum på 8-15 timer. Metaboliseringen skjer hovedsakelig i leveren via UDPGT (glukuronidering), men ca 25 % metaboliseres via CYP enzymer^[2] til glukuronidkonjugater. Nebrytningsproduktene er uten antiepileptisk effekt og utskilles hovedsakelig i urinen.

Val passerer både tynntarmsepitetet (CaCo-2 celler) og blod- hjerne barrieren (RBE4 celler)^[3]. I begge celletypene er passasjen avhengig av en innover rettet H⁺ gradient mens konsentrasjonsgradientene for Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ og Cl⁻ har mindre betydning. Flere monokarboksylerte syrer som for eksempel salicylat, benzoat, acetat, propionat, butyrat, hexanoat, diclofenac og ibuprofen hemmer Val-opptaket.

1.2 Metabolisme av Valproat under graviditet og i ammefasen

Analyser av navlestrengserum viser at Val akkumuleres i fosterblod^[4]. Ved termin kan således konsentrasjonen av Val være opptil 5 ganger høyere i fosterets serum enn i mors serum. Årsaken til dette er trolig at større mengder Val er bundet til albumin i føtalt blod fordi det er relativt lavt nivå av frie fettsyrer i fosterserum (Val konkurrerer med andre fettsyrer om binding til serumalbumin).

Val er meget teratogent og bør derfor helst unngås under svangerskapet. Kvinner i fertil alder som bruker Val anbefales å bruke antikonsepsjonsmidler og å bytte til et annet anti-epileptisk middel hvis de planlegger graviditet. Dersom det ikke finnes noen alternativer til bruk av Val skal kvinnen følges opp tett under svangerskapet, inkludert antenatal diagnostikk. Det er også foreslått at lavest mulig dose skal benyttes og at den daglige dosen fordeles på tre doser for å redusere svingningene i serumkonsentrasjonen av Val^[5]. Det er mulig at dette vil redusere risikoen for fosteret.

Det er vist at Val skilles ut i små, ubetydelige mengder i morsmelken^[6]. Et ammende barn vil få i seg mindre enn 5 % av den vekttilpassede daglige dosen til moren. Det foreligger derfor ingen anbefalinger om å unngå Val ved amming.

1.3 Valproat og Teratogenitet

Medfødte misdannelser er fysiske avvik fra det normale som er til stede fra fødselen av. Avvikene kan oppstå i alle store organer eller deler av kroppen. Det er beskrevet over 3000 ulike typer av medfødte misdannelser^[6]. Nesten 20 % av dødsfallene hos nyfødte skyldes medfødte misdannelser. Større misdannelser er strukturelle feil som påvirker hvordan personen ser ut og som krever medisinsk og/ eller kirurgisk behandling. Mindre misdannelser er feil som ikke skaper alvorlige helse- eller sosiale problemer. Mange av disse diagnostiseres sent; mens misdannelser påvises hos 2-3 % av de nyfødte, vil ca 10 % ha fått påvist medfødt fysisk avvik ved 5 års alder.

I en studie fra det australske antiepileptiske medisinregisteret fant man en rate på 15,1 % for større medfødte misdannelser ved eksponering for Val under svangerskapet^[7]. Hyppigheten av større misdannelser øker kraftig med daglige doser Val over 1400 mg. Sammenlignet med alle andre antiepileptiske midler gir eksponering for Val i løpet av første trimester en 2,59 ganger økt risiko for større misdannelser, og en 3,77 ganger økt risiko i forhold til den generelle populasjonen som ikke bruker antiepileptiske midler^[8].

Blant de hyppigste medfødte misdannelser ved bruk av Val under svangerskapet er nevrallrørsdefekter, hovedsakelig lumbosacral meningomyelocele (spina bifida aperta), og det er rapportert at insidensen av nevrallrørsdefekter ved eksponering for Val i fosterlivet kan være 1-5 %^[9, 10].

Andre medfødte misdannelser som assosieres med eksponering for Val i fosterlivet er facial spalte, kardiovaskulære-, genitale- og ekstremitetsmisdannelser^[11]. Risikoen for ekstremitetsmisdannelser hos barn av Val behandlede mødre er ca 6 ganger høyere enn for ikke-eksponerte barn.

Epilepsi hos mor er sannsynligvis ikke noen risikofaktor for medfødte misdannelser; raten av misdannelser hos barn av ubehandlede epileptiske mødre er omtrent den samme som hos barn av mødre uten epilepsi^[12].

1.4 Valproatembryopati

Under svangerskapet er fosteret mest følsom for teratogener under den aktive organogenesen (gestasjonsuke 3-8)^[5]. Noen organer (hjernen, tenner,-og ytre genitalia) fortsetter å utvikle seg aktivt utover denne perioden og er derfor også følsomme for teratogener i en lengre periode. Teratogener som påvirker hjernen, spesielt antiepileptiske midler, kan derfor skade fosteret selv om eksponeringen skjer etter første trimester av graviditeten. Eksponering for et teratogen gjennom hele svangerskapet er vanligvis farligere enn eksponering i en begrenset periode. En daglig dose av Val på 1000mg eller mer og/ eller i kombinasjon med andre antiepileptiskemidler (polyterapi) er forbundet med høyere teratogen effekt.

Valproatembryopati er et medfødt syndrom, (et syndrom er et sett med symptomer og tegn som kommer samtidig og som hører til en viss sykdom eller tilstand) og skyldes eksponering for Val under svangerskapet^[13]. De kliniske funnene inkluderer intrauterin veksthemming, høyt forhode, nedtrykket neserygg, hypertelorisme (økt avstand mellom øynene), epikantus folder, smal munn med tynn overleppe (lang glatt philtrum) og fyldig underleppe, lave

bakover- roterte ører og overlappende tær^[14](Fig.1). Mange av disse barna har også andre medfødte misdannelser. Det er blant annet rapportert om polydaktyli, clinodaktyli, hypospadi, kryptorkisme, metopisk kraniosynostose, palatum fissum og multiple hemangiomer. I tillegg har disse pasientene høy insidens av lærevansker, adferdsproblemer, forsinket tale og motorikk.



Fig 1. Valproate embryopathy

1.5 Valproate's effect on psychomotor development

Det er flere holdepunkter for at Val-eksposisjon i fosterlivet kan gi permanent cerebralt sekvele. Barn som har blitt eksponert for Val under svangerskapet har ofte en forsinket utvikling med redusert kognitiv funksjon, konsentrasjonsvansker og lærevansker^[15]. En studie av barn som var eksponert for Val i fosterlivet viste at prevalensen av lav intelligenskvosient (IQ<80) var på 19 % (4 av 21). Prevalensen av ekstremt lav IQ (IQ<70) var 10 % (2 av 21).^[16] Til sammenligning er gjennomsnittsverdien i normalbefolkningen 100, og kun 2,3 % av befolkningen har lavere IQ enn 70. En annen studie sammenlignet 169 barn som hadde blitt eksponert for antiepileptiske midler under svangerskapet, med 80 ikke- eksponerte barn^[17]. Hos de 41 barna som hadde blitt eksponert for Val, fant man signifikant reduksjon i verbal IQ.

Etter intrauterin eksposisjon for Val har man hos mus og rotter funnet tegn på atferdsendringer som ligner på dem man finner hos mennesker med autisme.^[18]

Forsøksdyrene hadde blant annet nedsatt sensibilitet for smerte og økt sensibilitet for ikke-smertefull stimuli, forminsket akustisk prepulsinhibering, repeterte/ stereotypisknende hyperaktivitet med mindre utforskende aktivitet og nedsatt antall av sosiale oppførsler og økt latens til sosial adferd. Intrauterin Val-eksponering i perioden da neuralrøret lukker seg førte til at forsøksdyrene hadde avvik i en rekke funksjonstester inkludert gripestyrke, motorisk aktivitet og vannlabyrint utførelse. Nevropatologisk og nevrofysiologisk undersøkelse viste også unormal anatomi og funksjon av de motoriske hjernenervekjernene. I lillehjernen ble det funnet redusert volum særlig i bakre lapp og antallet Purkinjeceller var redusert^[19]

Reduksjon i antall Purkinjeceller og redusert volum av cerebellum er også funnet hos mennesker med autisme. I en studie av barn som var eksponert for Val i fosterlivet ble det funnet autisme eller Asperger syndrom hos 5 av 56 (8,9 %)^[19]. Sammenlignet med den generelle befolkningen kan raten av autisme og Asperger syndrom være opp til 20 ganger høyere hos dem som er eksponert for Val i fosterlivet.

1.6 Molekylære virkningsmekanismer

Den antiepileptiske effekten av Val skyldes antagelig at medikamentet gir en signifikant økning i konsentrasjonen av neurotransmitteren gamma aminosmørsyre (GABA) i hjernen^[20]. GABA er en inhibitorisk virkende neurotransmitter, og en økning i GABA- konsentrasjonen kan forebygge anfall. Virkningsmekanismen kan dels være at Val er en svak inhibitor av to enzymer, GABA transaminase og succinat semialdehyd dehydrogenase, som inaktiverer GABA. Val virker i tillegg ved å blokkere spenningsavhengige natriumkanaler i nevronmembranene.

Det er foreslått flere forklaringer på Vals teratogene virkning^[21, 22]. En mulig forklaring er en anti-folat effekt ved at Val virker som en antimetabolitt til folsyre. Redusert embryonal konsentrasjon av folsyre kan forstyrre genespresjonen, øke oksydativt stress i fosteret og føre til forandringer i proteinsyntesen. Det er anbefalt å ta 4-5 mg folat hver dag i forkant av et svangerskap og i de tre første månedene^[23]. Det er vist at perikonseptuell folat reduserer spontanaborter og premature fødsler hos kvinner som behandles med Val. En annen mulig forklaring på Val sin teratogene virkning er at Val kan hemme histon-deacetylasen (HDAC)^[24]. Dette kan forhindre induksjon av kromatinforandringer som er nødvendige for at transkripsjonsfaktorer og RNA- polymerase kan feste seg til DNA og dermed modulere transkripsjonen av gener. Ved å hemme histon-deacetylasen kan Val føre til forstyrrelser i cellesyklus, og dermed føre til endringer i proliferasjonen og indusere apoptose. I en studie på xenopus- og zebrafisk embryoer ble det vist at Val eksponering førte til vekstretardasjon og en mengde andre medfødte misdannelser, grunnet hemming av HDAC^[25].

1.7 Lillehjernen og dens utvikling

Cerebellum stammer hovedsakelig fra de rombiske leppene til metencephalon^[26]. Utviklingen av lillehjernen begynner allerede i slutten av sjette fosteruke hos mennesker og lillehjernen fortsetter å vokse til toårsalder. Mot slutten av sjette fosteruke begynner de rombiske leppene til metencephalon å bli tykkere og danner et par cerebellære plater. (Fig 2.) Innen den andre måneden har de kraniale delene av de voksende rombiske leppene møtt hverandre over

midtlinjen og dannet et primordium som dekker fjerde ventrikkel. I midten av tredje måned begynner den voksende cerebellum å bule dorsalt og danner en kuleformet hevelse i den kraniale enden av rombencephalon. På dette stadiet er cerebellum separert i en cranial og en caudal del av en transversal grop, kalt den posterolaterale fissuren. Den kaudale delen består av et par flocculonodulære lapper som representerer den mest primitive delen av cerebellum. Den større craniale delen består av en smal medial del, vermis, som forbinder de to brede cerebellære hemisfærene. Den craniale delen vokser raskere enn den caudale delen, og vil etter hvert være den dominerende delen av lillehjernen.

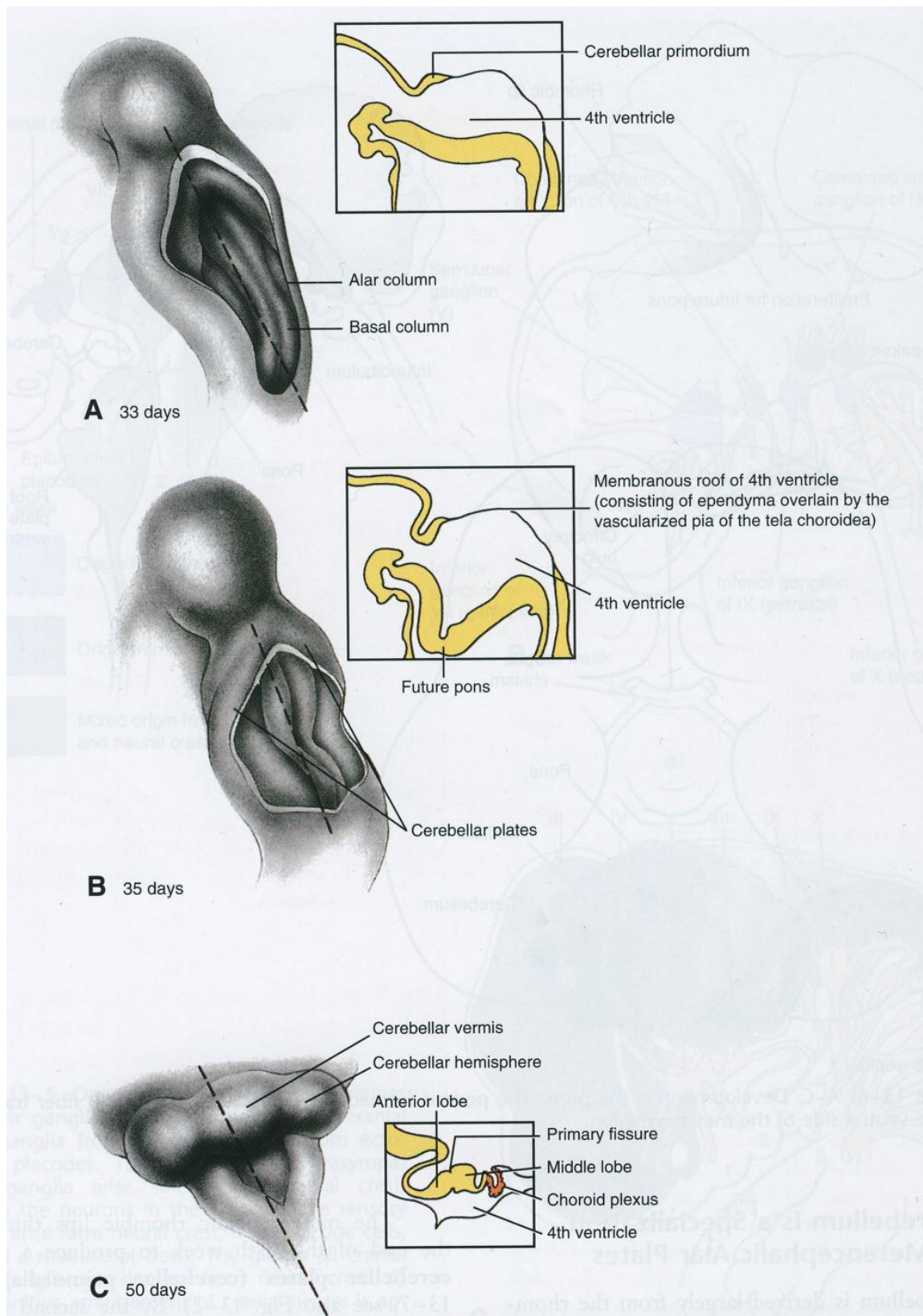
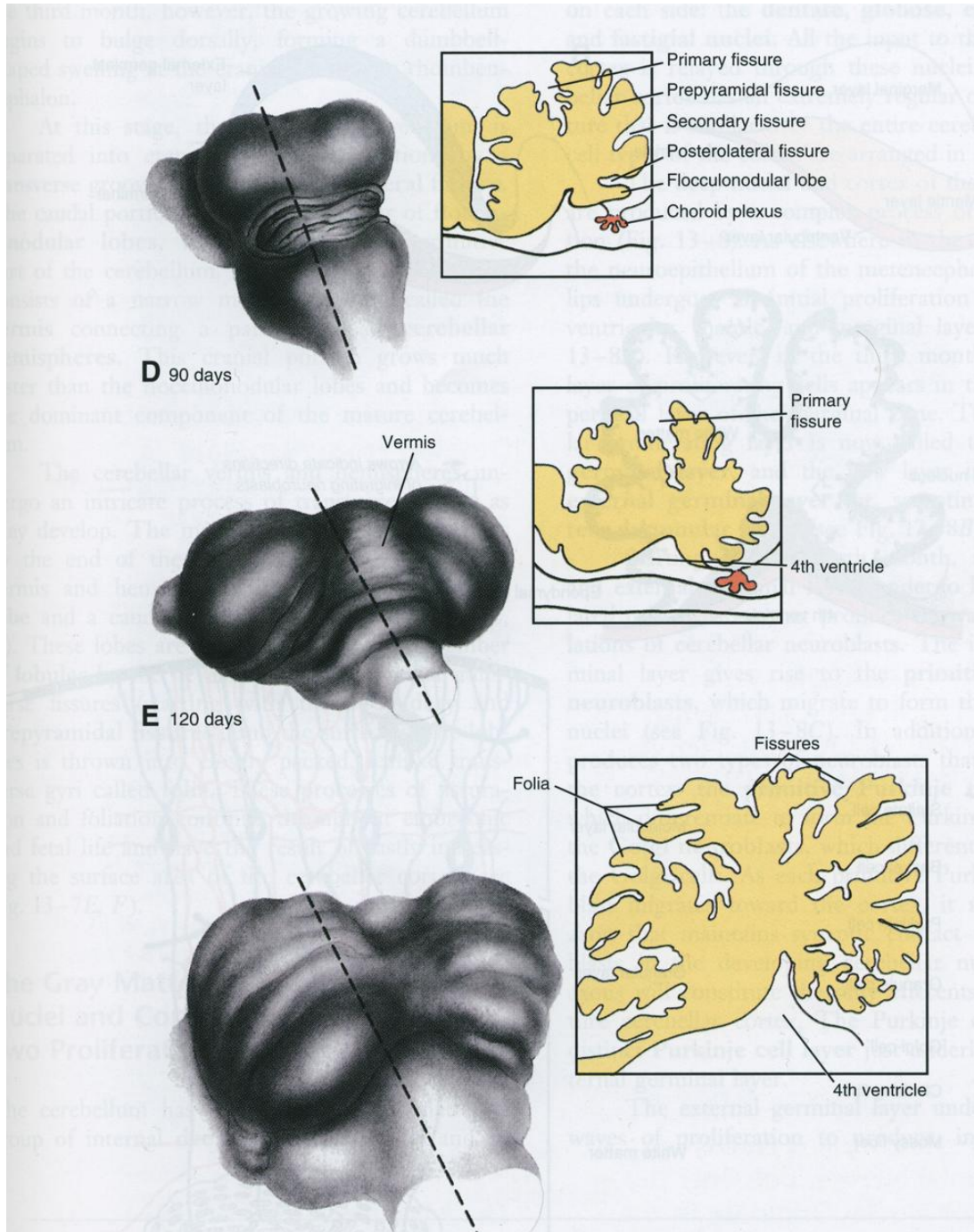


Fig 2. Utviklingen av cerebellum og plexus choroideus i fjerde ventrikel. A og B: Proliferasjon av celler i de rhombiske leppene til metencephalon danner de cerebellære platene. C: Videre vekst danner to laterale cerebellære hemisfærer og en sentral vermis. Den primære fissuren kommer til syne og deler cerebellum i fremre og midtre lapper. Plexus choroideus dannes i takplaten til fjerde ventrikel.

Vermis og hemisferene gjennomgår flere transversale foldinger. I slutten av tredje måned deler den store primære fissuren vermis og hemisfærene inn i en kranial anterior lapp, og en caudal midtre lapp. Disse lappene deles ytterligere i mindre lapper. Overflaten på de små lappene pakkes tett sammen som løvtynne, transversale gyri som kalles foliae. Foldeprosessen fortsetter gjennom hele fosterlivet og bidrar til å øke overflatearealet av cerebellum.



D-F: Det dannes videre flere fissurer som deler den ekspanderende cerebellum inn i flere lapper. Denne prosessen øker cerebellums overflate enormt.

Lillehjernebarken har en regelmessig arkitektur og de ulike typene av celler i barken er arrangert i lag. De dype kjernene og barken dannes ved at nevroepitelet i de rombiske leppene gjennomgår en initial proliferasjon for å danne de ventrikulære-, dekk- og marginale lagene. (Fig3.) I tredje måned dukker det opp et sekundært lag av prolifererende celler i det overfladiske laget av marginalsonen. Det prolifererende ventrikulære laget kalles nå det indre germinale laget og det nye laget kalles det ytre germinale laget. I fjerde måned begynner cellene i det indre og det ytre laget å dele seg for å produsere de ulike cerebellære neuroblastene. Det indre laget gir opphav til de primitive nukleære neuroblastene som vandrer for å danne de cerebellære kjernene. Det indre laget gir også opphav til to typer neuroblaster som vandrer til barken: primitive purkinje- neuroblaster som blir til Purkinjeceller og golgi- neuroblaster som blir til Golgiceller. Purkinje- neuroblastene som vandrer mot barken strekker ut axoner som danner synapser med neuroblastene i de cerebellære kjernene. Disse axonene vil være de eneste efferente fibrene i den modne barken. Purkinjecellene danner et eget purkinjecellelag^[24]. Mellom purkinjecellelaget og det ytre korncellelaget finnes det et lag som heter molekylærlaget. Dette laget består av det voksende dendrittreet til Purkinjecellene, samt cellekjernene og dendritter av Bergmannglia, aksoner eller såkalte parallelfibre av kornceller og stellatceller.

Det ytre germinale laget danner etter hvert forløpere til basketceller, kornceller og stellatceller som vandrer til det ytre korncellelaget. Kornceller som er den overlegent mest tallrike nevrontypen i lillehjernen, migrerer fra det ytre til det indre korncellelag, et område innenfor Purkinjecellene, hvor de danner det indre korncellelaget i den endelige barken. (Fig 4.) De gjenværende basket- og stellat- neuroblastene danner det molekylære laget rett utenfor Purkinjecellene. Under utviklingen migrerer alle korncellene fra det ytre til det indre korncellelaget og det ytre korncellelaget forsvinner (ca 2 års alder i mennesker). Tilslutt danner de germinale lagene glioblaster som differensierer til astrocytter og oligodendrocytter. Lagene i lillehjernen er godt konserverert hos alle virveldyr.

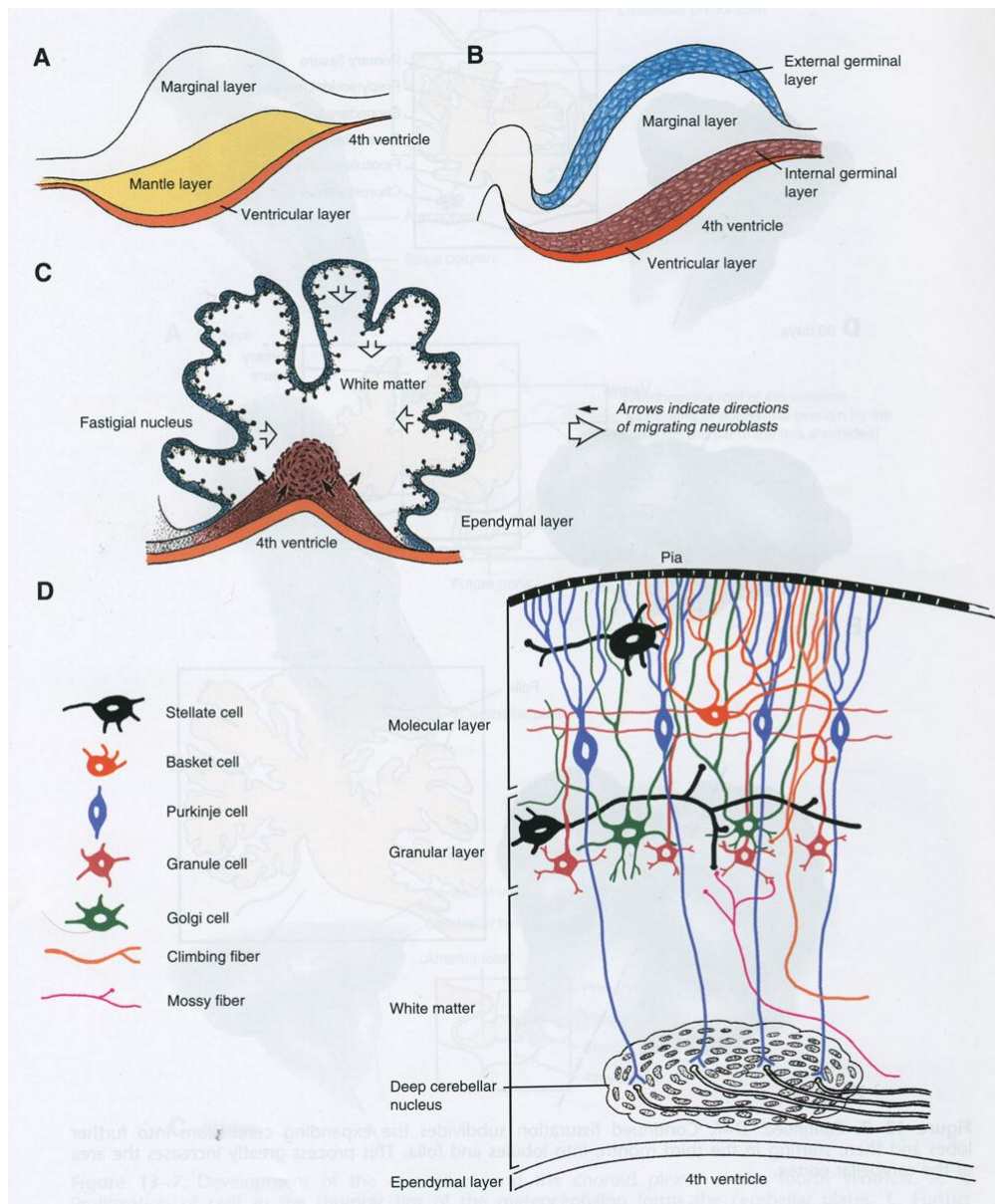
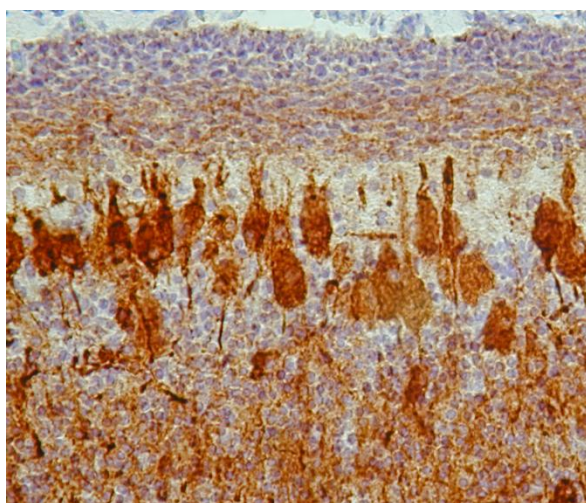


Fig 3. Cytodifferensiering av lillehjernen



Ytre korncellelag

Molekylært lag

Purkinjecellelag

Indre korncellelag

Fig 4. Lillehjernebarken til kyllingembryo farget med en nevronmarkør

2.0 PRAKTISK DEL

2.1 Introduksjon

2.1.1 Kyllingmodellen

Ca 300 år før Kristus beskrev Aristoteles hvordan man kunne åpne et rugeegg og se bevegelsene til kyllingfosteret ^[27] Den eksperimentelle embryologien startet ca år 1900. Graeper utførte vitalfarging i 1929 og i 1932 ble den første transplantasjonen mellom arter utført av Weddington. Senere ble kyllingmodellen brukt til å oppdage blant annet lem-mønsteret, crista neuralis sin skjebne, notochord reguleringen av dorsoventral polaritet og somittenes rolle i segmenteringen.

Det første dynamiske genekspressjonsmønsteret ble også funnet i kyllingembryoer. Kyllingmodellen er en mye brukt modell og har sine fordeler ved at hele kyllinggenomet er sekvensert, man har cellelinjer fra embryonale stamceller og virale vektorer for stabile transgene linjer. Videre er modellen enkel og billig og uten krav til godkjent dyrestall. Embryoet kan lett manipuleres medikamentelt og utviklingsstadiene følger tett på hverandre (rugetid 20-21 dager). Man kan også lage primærkulturer av cerebellære kyllingnevroner.

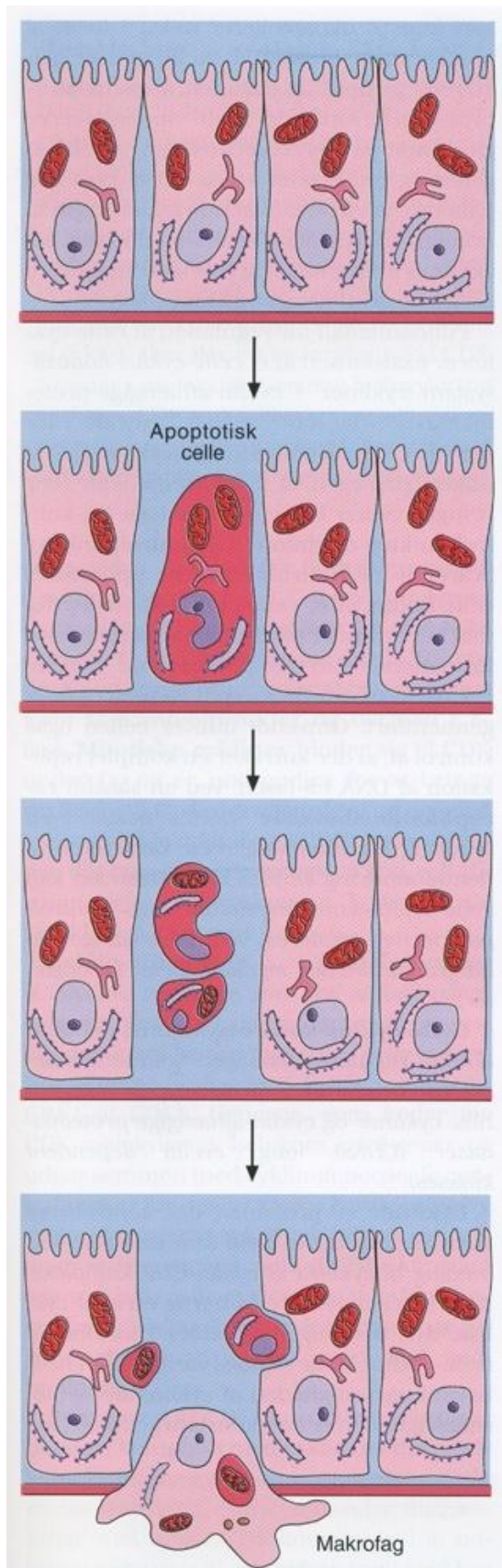
2.1.2 Kyllingembryologi

Når høna legger et egg er utviklingen av en kylling allerede godt i gang. ^[28, 29] En to- laget plate som består av mange tusen celler ligger på toppen av plommesekken. Kyllingembryoet har en sirkulær, flat geometri og består av to konsentriske ringer av celler. De ytterste cellene prolifererer raskere enn de andre cellene i embryoet. Cellene i midten av embryoet er ikke i kontakt med membranen, men holdes sammen ved hjelp av E-cadherin cellekontakter til basal laminaen. All embryonal masse er derivert fra et epitelcellelag, epiblasten. Epiblasten vil etter 6-8 timer differensieres til tre kimlag, ektoderm, mesoderm og endoderm. I løpet av gastruleringen vandrer de ulike celletypene til sine definerte plasser. Dette er en prosess som krever stor grad av koordinert cellebevegelese. I løpet av denne prosessen går de cellene som tilhører mesoderm og endoderm inn i embryoet og danner det som kalles primitive streak, et tynt bånd av celler som strekker seg fra kanten av den embryonale platen. Dette er det første synelige tegn som markerer hode- til- haleaksen. Det vaskulære systemet er noe av det første som dannes. Etter dag én kan man se blodøyer, og etter dag to er sirkulasjonen etablert. Hele tiden vokser embryoet og forandrer fasong. I løpet av dag tre og fire kan man gjenkjenne hovedstrukturer som hode, trunkus og hale, og også mer spesifikke organer som ekstremiteter, øyne, lunger med mer. Den siste delen av utviklingen skjer fra dag 10 til og med dag 20 eller 21. I denne perioden er det hovedsakelig vekst, men også ossifikasjon av skjellettet og dannelse av fjær som finner sted.

2.1.3 Celledød

Celledød kan enten skyldes skadelige påvirkninger eller være et ledd i en kontrollert og regulert cellesyklus^[30]. Celler kan dø både ved nekrose, apoptose og autofagi. Her omtales apoptose siden denne typen celledød ble undersøkt eksperimentelt.

Apoptose eller såkalt programmert celledød er en energikrevende og genetisk kontrollert prosess, som utløses under bestemte omstendigheter. Apoptose er et viktig ledd i den normale fosterutviklingen hvor mange celler dør ved apoptose. For eksempel fjernes sammenvoksnings mellom fingre og tær ved apoptose. Apoptose er ofte et ledd i fjernelsen av enkelt celler, mens nekrose ofte er død av grupper av celler. Apoptose kan sees i lysmikroskop ved at kjernens kromatin kondenserer og fragmenterer og at cellen skrumper, samtidig med at cytoplasmaet farges kraftig eosinofilt. Apoptose er en energikrevende prosess hvor karyolyse av kromatinet skjer ved hjelp av endonucleaser. Cellemembranen og organeller forblir intakte veldig lenge før de fagocyteres av omkringliggende celler og makrofager. Det induseres derfor ikke inflammasjon når celler dør ved apoptose. Under utvikling av hjernen er programmert celledød ved apoptose et svært viktig fenomen.^[31]



forløpet av apoptose.

Fig 5. Skjematisk tegning av det morfologiske utseende av

2.2 Hensikt

I denne studien undersøkes det hvordan eksponering for Val i fosterlivet påvirker utviklingen av lillehjernen. Det sammenlignes antall apoptoser og prolifererende celler i cerebellum fra kyllingfostere som har blitt eksponert for Val, og kyllingfostere som har blitt eksponert for løsningsmiddelet (NaCl).

2.3 Material og metode

2.3.1 Material

Befruktede kyllingegg (gallus gallus) ble levert fra Samvirkekylling i Våler. Hvert egg veide 50-60g. Eggene ble inkubert ved 37°C i en rugemaskin, Covalutto 20+20, Novital. Valproic acid sodium salt (P4543-10G) ble levert av Sigma Aldrich. BrdU og PCNA ble levert av Dako A/S, Norge. NaCl 9mg/ml Fresenius Kabi ble innkjøpt fra Ullevål apotek. 4 % fosfatbuffert formaldehyd ble laget ved Oslo universitetssykehus, Ullevål. Hematoxylin-Monohydrat (C.I.75290) M= 320,29 g/mol C₁₆H₁₄O₆ H₂O produsert av Merk og Eosin yellowish (C.I.45380) produsert av BDH, ble begge levert av VWR International AS i Oslo.

2.3.2 Metode

Kyllingembryoer

Hvert egg veide mellom 50-60 gram. Eggene ble satt i en rugemaskin med 37 °C (Covattutto 20+20, Novital) i 16 dager. Deretter ble eggene gjennomlyst for å verifisere at det var et levende foster i egget og for å finne ut hvor de store blodårene i egget var. Det ble laget et hull i hvert egg på ca 1mm. Via åpningen ble enten Val eller en saltvannskontroll i en standardisert mengde av 250µl injisert i amnionhulen. Val ble injisert i fire forskjellige doser (5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg og 40mg/kg). Per dose ble det injisert 3 egg. Eggene ble deretter inkubert i nye 24 timer. På dag 17 ble BrdU (Bromodeoxyuridine), en markør for celler i syntesefasen, injisert i alle egg. Tre timer senere ble embryoet anestesert i isvann i 7 min før de ble avlivet. Hodene ble fiksert i 4 % fosfatbufret formalin i 24 timer. Deretter ble hjernen preparert ut fra skallen og fiksert i nye 24 timer. Coronarsnitt ble laget av cerebellum og farget med hematoxylin/ eosin. Snittene ble også immunfarget med PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

Immunhistokjemi

Formalinfikserte parafin innstøpte snitt ble deparaffinisert, dehydrert og demaskert i en mikrobølgeovn i 24 minutter i Tris/EDTA, TE, pH 9,1. Monoklonale muse- antiprolifererende cellekjerneantistoffer (PCNA, PC10) Kodnr. M 879 titer 1: 3500 (DAKO), ble brukt som primært antistoff. Antigen-antistoff reaksjonen ble visualisert med DAKO "En vision horse radish peroxidase system" som bruker 3,3` diaminobenzidin som kromogen. Maskinen som ble brukt til immunhistokjemien var DAKO Autostainer pluss.

Registrering av celledød og proliferasjon i kyllinglillehjerter

Snittene ble undersøkt med 40x objektiv. I snittene som var farget med H+E (Hematoxylin/Eosin) ble antall apoptoser registrert i 3 uavhengige synsfelt. Snittene som var farget med PCNA ble fotografert i tre ulike synsfelt og bildene ble brukt i analyseprogrammet, Image J. Programmet registrerte totalt antall celler og antall celler som var i delingsfasen gjennom oppsplitting i forskjellige fargekanaler. Dermed kunne det bestemmes kvosient prolifererende celler i prosent av totalt antall celler i synsfeltet.

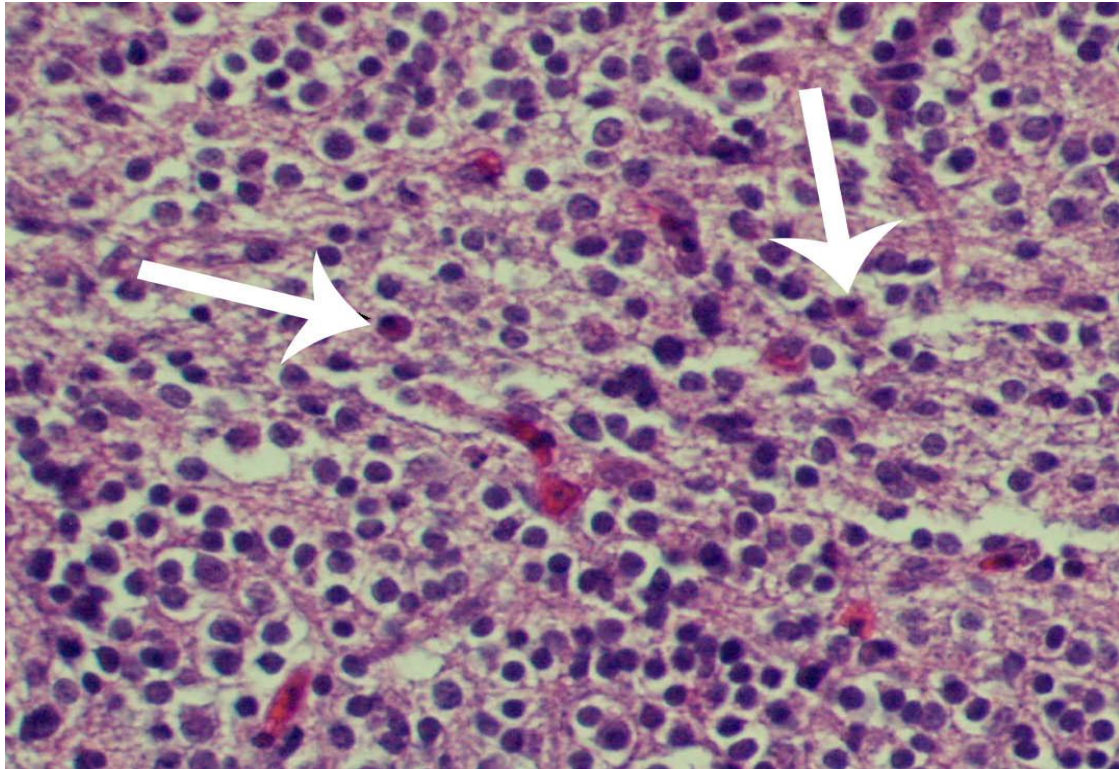


Fig 6. Bildet viser det indre korncellelaget i kylling cerebellum farget med Hematoxylin og Eosin. Pilene peker på celler som viser typisk utseende på apoptose; kondensert og fragmentert kjerne og eosinofilt cytoplasma.

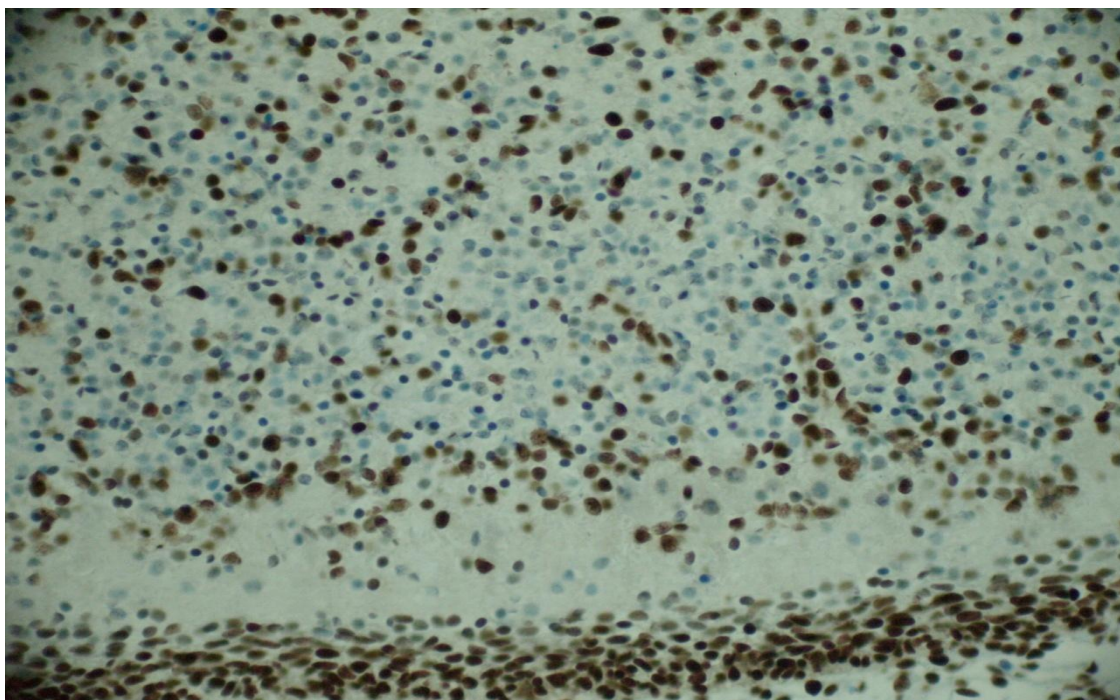


Fig 7. Bildet viser det indre korncellelaget i kylling cerebellum farget med PCNA. De brune cellene er celler i proliferasjonsfasen.

Kylling korncellekultur

Kornceller ble isolert fra lillehjernen i kyllingfostre på E16. Vevet ble behandlet med forskjellige løsninger, den første inneholdt BSA og trypsin, den andre inneholdt DNase, trypsininhibitor og MgSO_4 . Etter trypsiniseringen, ble cellesuspensjonen satt i $\text{MgSO}_4/\text{CaCl}_2$ løsning og sentrifugert en tredje gang. Deretter ble $1,8 \times 10^6$ celler/ml spredt utover en poly-L-Lysin dekket skål og inkubert i BME som inneholdt 10 % hesteserum og 5 % kyllingserum, begge varmeinaktivert ved 37°C og 5 % CO_2 . Etter tre dager ble cellene inkubert med Val eller NaCl i 15 min, vasket og deretter inkubert i serumfritt medium i 24 timer. Tilslutt ble Trypanblå blandet med NaCl 1,8 % (blandet 1:1) tilsatt hver cellekulturskål. Skålene ble inkubert på 37°C og 5 % CO_2 i 30 min. Celler som var farget blå (døde celler) og celler uten farge (levende celler) ble telt på 100 ganger forstørrelse. Fire synsfelt ble telt og prosentandel døde celler ble registrert.

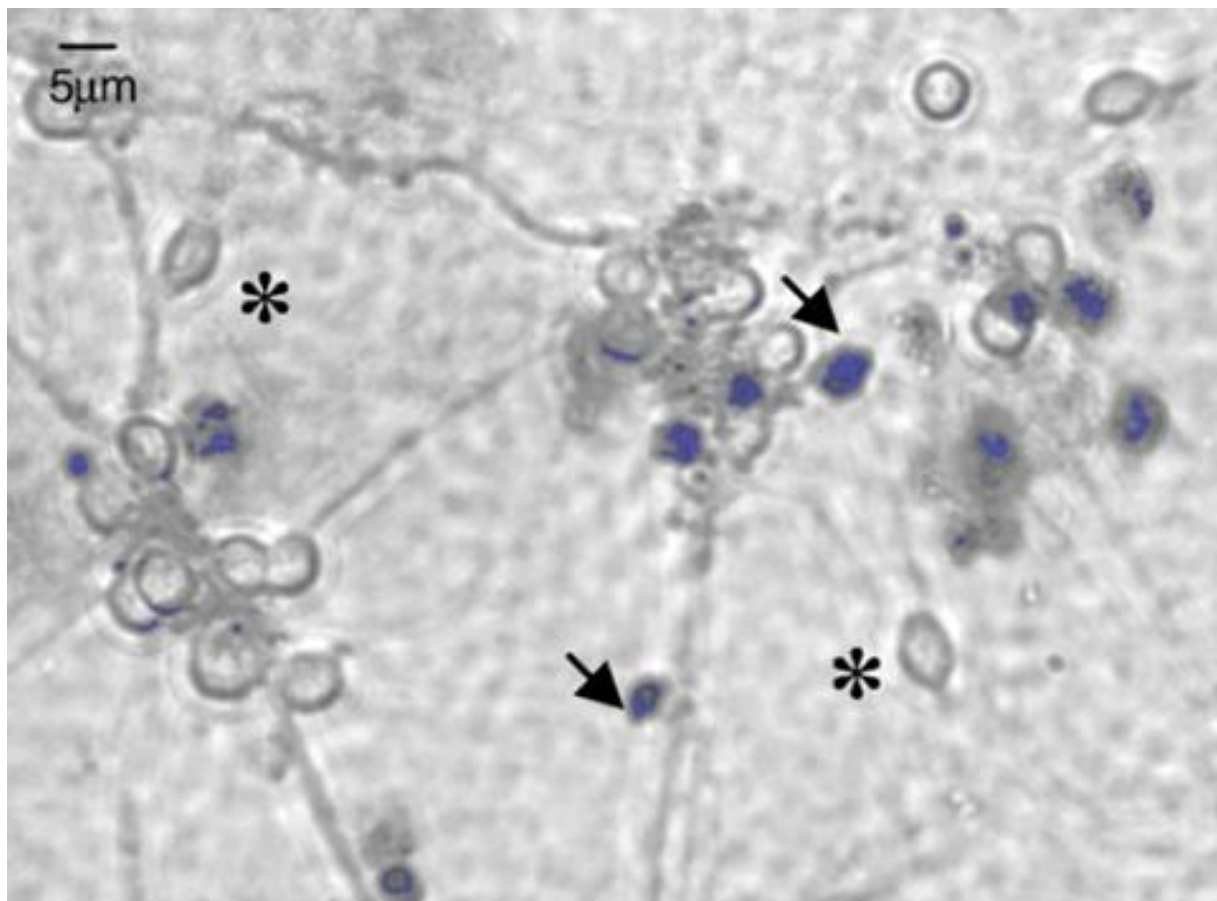


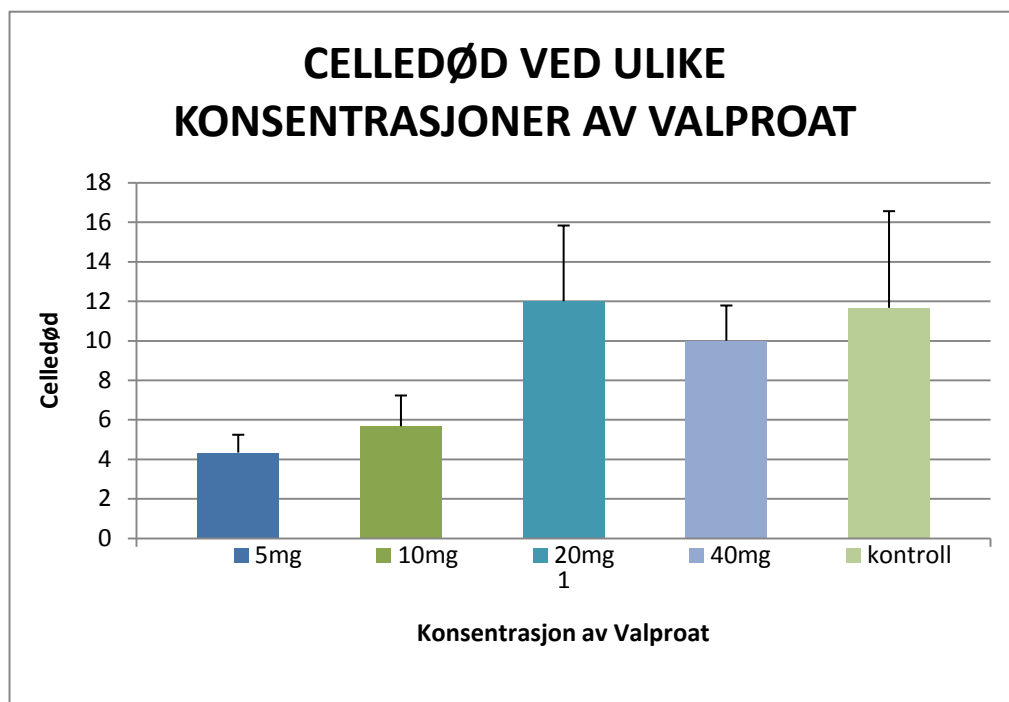
Fig 8. Val inducerer celledød i kylling korncellekultur. Celler som inneholder trypanblå (piler, døde celler) og celler som ikke inneholder trypanblå (*, levende celler) vises i fasekontrast.

3.0 RESULTAT

Man ser en tendens til en dosebasert økning i apoptoseraten av kornceller i lillehjernen til valproatbehandlede kyllinger, men det ble også funnet høye apoptoserater i kontrollgruppen (se diskusjon). - Videre ser man en økning i antall prolifererende kornceller ved eksponering for Val. I kylling- korncellekultur fant man en økning i nevrondød ved den høyeste dosen med Val (500µM), mens de lavere dosene ikke skilte seg vesentlig fra kontrollen.

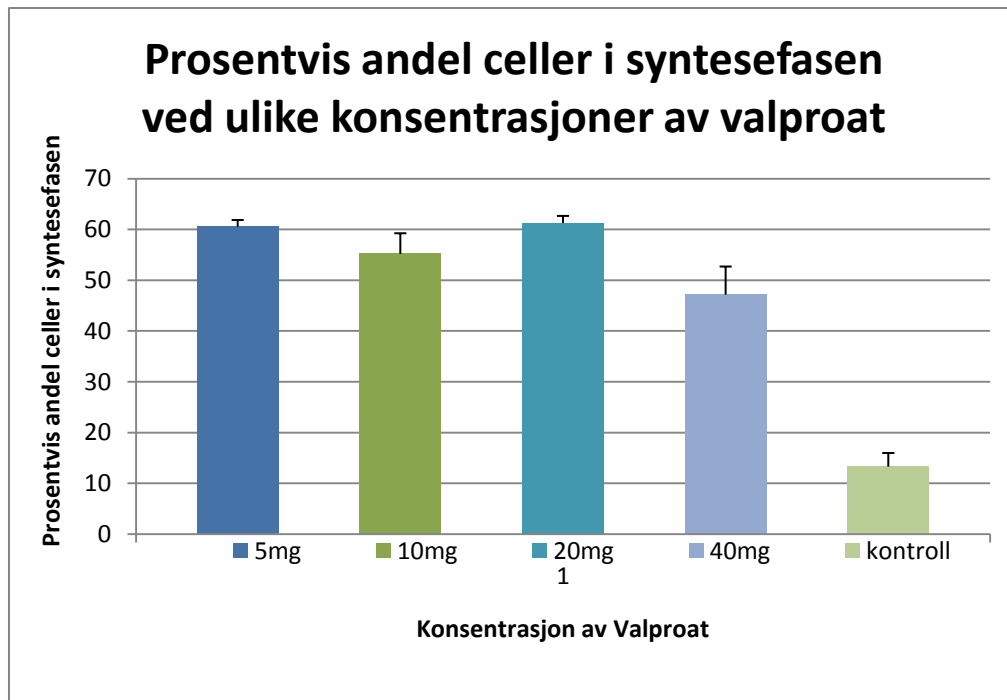
3.1 Apoptosetelling

Injisert stoff	Snitt nr	Ant. Apoptoser, 3 synsfelt	Gjennomsnitt apoptoser pr dose
5mg Valproat	1109	5	
	1110	3	
	1111	5	4,33
10mg Valproat	1112	5	
	1113	8	
	1114	4	6,66
20mg Valproat	1115	7	
	1116	11	
	1117	18	12
40mg Valproat	1118	12	
	1119	11	
	1120	7	10
Kontroll	1121	19	
	1122	9	
	1123	7	11,66



3.2 Immunhistokjemi

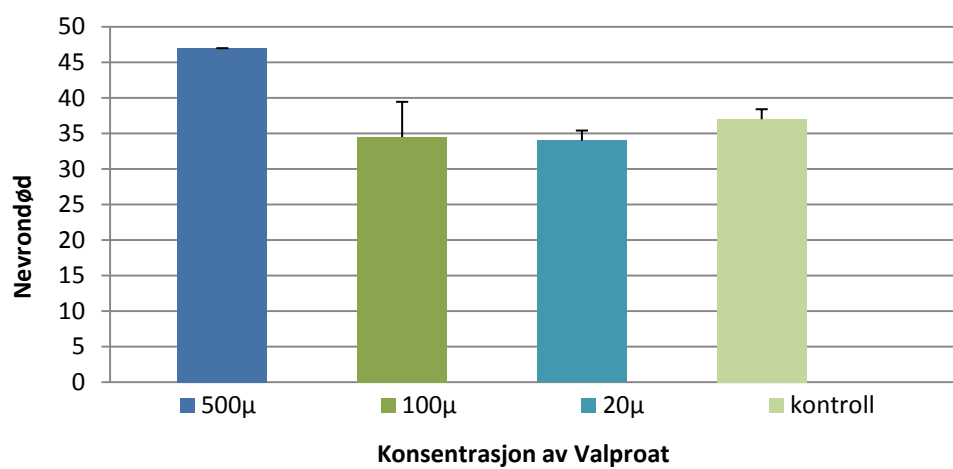
Injisert stoff	Prosentvis andel celler i syntesefasen
5mg Valproat	60,6
10mg Valproat	55,2
20mg Valproat	61,3
40mg Valproat	47,2
Kontroll	13,3



3.3 Celledødsbestemmelse ved Trypan blå farging

Stoff	Nevrondød
20 µM Valproat	34
100µM Valproat	34,5
500µM Valproat	47
Kontroll	37

Nevrondød i kylling korncellekultur



4.0 Diskusjon

Lagene i lillehjernen er godt konserverert i alle virveldyr. –Det ligger derfor godt til rette for å benytte kyllingembryo som modellsystem for lillehjerneskada i fosterlivet. Kyllingembryoet er lett å manipulere medikamentelt på de ulike utviklingstrinn da det ligger inne i et egg. Rugetiden for kylling er kort (20-21 dager) med rask organutvikling. Den siste uken i egget tilsvarer cirka siste delen av andre og tredje trimester hos menneske, da det hovedsakelig foregår vekst av fosteret.

En lett økning i antall apoptoser ble funnet ved økende dose Val. Ved en dose på 5mg Val ble det observert en gjennomsnittlig apoptoserate på 4,33, mens apoptoseraten økte til 12 ved en dose på 10mg Val. Dette kan tyde på at den skadelige effekten av Val er økende med økende dose. Videre ble det ikke funnet noen økning i apoptoseraten ved doseøkning fra 10mg til 20mg Val, henholdsvis 12 og 10 i gjennomsnittlige apoptoser pr dose. Dette kan muligens forklares ved at den skadelige effekten øker opp til et visst nivå for deretter å flate ut. Dette bør undersøkes nærmere med flere forsøk. Resultatene svekkes av at det også ble observert en relativt høy apoptoserate i kontrollen, 11,6 pr 10 synsfelt. Imidlertid har tidligere studier på kyllingfostre viser en gjennomsnittlig apoptoserate på 7 i kontrollgruppen.^[32] Gjennomføring av flere forsøk vil derfor være viktig for å bekrefte våre funn.

Det ble funnet en økning i antall prolifererende celler ved eksponering for Val sammenlignet med kontrollen. Tidligere studier har vist at denne effekten av Val skyldes en økning av cyklin D2, som medierer overgangen fra G1 til S- fase i cellecyklus, og prostaglandin E2 syntase^[33]. Det ble ikke observert noen dose-responseffekt, samtlige doser Val ga økt proliferasjonsrate. Økt proliferasjon kan muligens føre til at flere celler dør ved apoptose blant annet på grunn av mangel på vekstfaktorer. Økt proliferasjon kan også føre til at det skjer flere feilkoblinger mellom cellene. Psykomotoriske forandringer som man observerer hos barn som er eksponert for Val i fosterlivet kan være et resultat av dette.

I korncellekultur ble det kun funnet økt nevrondød ved den høyeste dosen Val. Val konsentrasjonen må overskride en viss verdi før man kan observere skadelige effekter. Dette er også observert i studier på mennesker hvor man finner en kraftig økning i misdannelser hos barn av mødre som har hatt et daglig inntak av Val på over 1400mg i løpet av svangerskapet.^[7]

Konklusjon og implikasjoner for videre forskning

Kyllingmodellen er velegnet til å undersøke den nevrotoksiske effekten av Val på utviklingen av lillehjernen i fosterlivet. Våre pilotforsøk synes å indikere at Val behandling gir en lett økning i antall prolifererende kornceller og en dosebasert økning i apoptoseraten av kornceller i lillehjernen. I denne pilotstudien ble det dog kun undersøkt et lite antall kyllinger. Det vil derfor være nødvendig å gjennomføre flere forsøk for å bekrefte disse preliminare funnene.

Referanser

1. *Norsklegemiddelhåndbok for helsepersonell* 2007. 907-908.
2. *Felleskatalogen*. 2008.
3. Fischer, W., et al., *Transport of valproate at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells: mechanism and substrate specificity*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. **70**(2): p. 486-92.
4. Albani, F., et al., *Differential transplacental binding of valproic acid: influence of free fatty acids*. Br J Clin Pharmacol, 1984. **17**(6): p. 759-62.
5. Ornoy, A., *Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus?* Reprod Toxicol, 2009. **28**(1): p. 1-10.
6. Ericson, K. www.answers.com. 2009.
7. Eadie, M.J. and F.J. Vajda, *Should valproate be taken during pregnancy?* Ther Clin Risk Manag, 2005. **1**(1): p. 21-6.
8. Koren, G., et al., *Major malformations with valproic acid*. Can Fam Physician, 2006. **52**: p. 441-2, 444, 447.
9. Fried, S., et al., *Malformation rates in children of women with untreated epilepsy: a meta-analysis*. Drug Saf, 2004. **27**(3): p. 197-202.
10. Dalens, B., E.J. Raynaud, and J. Gaulme, *Teratogenicity of valproic acid*. J Pediatr, 1980. **97**(2): p. 332-3.
11. Rodriguez-Pinilla, E., et al., *Prenatal exposure to valproic acid during pregnancy and limb deficiencies: a case-control study*. Am J Med Genet, 2000. **90**(5): p. 376-81.
12. Holmes, L.B., et al., *Intelligence and physical features of children of women with epilepsy*. Teratology, 2000. **61**(3): p. 196-202.
13. Winter, R.M., et al., *Fetal valproate syndrome: is there a recognisable phenotype?* J Med Genet, 1987. **24**(11): p. 692-5.
14. Schorry, E.K., S.G. Oppenheimer, and H.M. Saal, *Valproate embryopathy: clinical and cognitive profile in 5 siblings*. Am J Med Genet A, 2005. **133A**(2): p. 202-6.
15. Dean, J.C., et al., *Long term health and neurodevelopment in children exposed to antiepileptic drugs before birth*. J Med Genet, 2002. **39**(4): p. 251-9.
16. Eriksson, K., et al., *Children exposed to valproate in utero--population based evaluation of risks and confounding factors for long-term neurocognitive development*. Epilepsy Res, 2005. **65**(3): p. 189-200.
17. Adab, N., et al., *The longer term outcome of children born to mothers with epilepsy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004. **75**(11): p. 1575-83.
18. Wagner, G.C., et al., *A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate*. J Autism Dev Disord, 2006. **36**(6): p. 779-93.
19. Rasalam, A.D., et al., *Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder*. Dev Med Child Neurol, 2005. **47**(8): p. 551-5.
20. Rang, D., Ritter, Flower, *Rang and Dale` Pharmacology*. sixth ed. 2007: Churchill livingstone Elsevier. 581.
21. Wegner, C. and H. Nau, *Diurnal variation of folate concentrations in mouse embryo and plasma: the protective effect of folinic acid on valproic-acid-induced teratogenicity is time dependent*. Reprod Toxicol, 1991. **5**(6): p. 465-71.
22. Wegner, C. and H. Nau, *Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis*. Neurology, 1992. **42**(4 Suppl 5): p. 17-24.

23. Pittschieler, S., et al., *Spontaneous abortion and the prophylactic effect of folic acid supplementation in epileptic women undergoing antiepileptic therapy*. J Neurol, 2008. **255**(12): p. 1926-31.
24. Piel, C.J., et al., *Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36734-41.
25. Wiltse, J., *Mode of action: inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin--developmental effects of valproic acid*. Crit Rev Toxicol, 2005. **35**(8-9): p. 727-38.
26. Larsen, W.J., *Human embryology*. third ed. 2001: Churchill Livingstone.
27. Aden, P.
28. Davey, M.G. and C. Tickle, *The chicken as a model for embryonic development*. Cytogenet Genome Res, 2007. **117**(1-4): p. 231-9.
29. Chuai, M. and C.J. Weijer, *The mechanisms underlying primitive streak formation in the chick embryo*. Curr Top Dev Biol, 2008. **81**: p. 135-56.
30. Geneser, F., *Histology*. first ed. 2006: Munkegaard Danmark.
31. Buss, R.R., W. Sun, and R.W. Oppenheim, *Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 1-35.
32. Aden, P., et al., *Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum*. Brain Res, 2008. **1236**: p. 39-48.
33. Monti, B., E. Polazzi, and A. Contestabile, *Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection*. Curr Mol Pharmacol, 2009. **2**(1): p. 95-109.